

Génie génétique et amélioration du riz et du cotonnier

C. PANNETIER

CIRAD-CA/INRA, Centre de Versailles,
78026 Versailles Cedex, France

E. GUIDERDONI

CIRAD-CA/BIOTROP, BP 5035,
34032 Montpellier Cedex 1, France

B. HAU

CIRAD-CA, BP 5035
34032 Montpellier Cedex 1, France

Les recherches sur la transformation génétique du cotonnier pour la résistance aux insectes sont réalisées au laboratoire de biologie cellulaire de l'INRA, centre de Versailles, dirigé par Y. CHUPEAU.

Les personnes suivantes ont participé ou participent au programme : J. TOURNEUR (chercheur CNRS), P. COUZI (technicien INRA), M. MAZIER (thèse 1991-1994), V. DUMANOIS-LE TAN (thèse 1991-1994), M. GIBAND (chercheur CIRAD), P. MONTORO (post-doctorat CIRAD). Au laboratoire BIOTROP (CIRAD) à Montpellier, les personnes ci-après ont participé ou participent au programme de génie génétique du riz :

T. LEGAVRE (chercheur CIRAD-GERDAT), H. CHAIR (thèse 1991-1994), N. MEZENECV (DEA Rennes, 1992), D. FERRAND (DESS Angers, 1993), F. GEORGET (DESS Angers, 1994), S. PICHOT (DEA, ENSAIA Nancy, 1994).

CIRAD : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, France

CNRS : Centre national de la recherche scientifique, France

CSIRO : Commonwealth Scientific and Industrial Organization, Australie

INRA : Institut national de la recherche agronomique, France

USDA : United States Department of agriculture, Etats-Unis

Les insectes causent sur certaines cultures des dégâts considérables, obligeant à une utilisation massive d'insecticides chimiques. Les conséquences sur l'environnement et sur les équilibres écologiques sont telles qu'elles rendent nécessaires une évolution importante des approches de la protection phytosanitaire. Le transfert de gènes codant pour des protéines entomopathogènes permet la création de variétés de riz et de cotonnier résistant à certains de ces ravageurs.

Si la sélection classique a permis des améliorations très significatives des riz et des cotonniers en particulier pour le rendement et la qualité des produits, certains problèmes posés par ces deux cultures sont difficilement accessibles aux méthodes classiques d'amélioration variétale. C'est le cas de la résistance aux ravageurs et plus particulièrement aux insectes. Si aucune méthode de lutte n'était appliquée, 40 % de la production cotonnière mondiale serait perdue. Les lépidoptères, principalement *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens* et *Pectinophora gossypiella*, sont à l'origine de plus de 70 % des pertes. Pour le riz, des insectes foreurs des tiges, également de l'ordre des lépidoptères, occasionnent des pertes de 10 à 30 % selon le degré d'intensification de la culture. De plus, l'objectif d'augmen-

tation de la productivité favorise une utilisation de plus en plus massive de produits chimiques, toujours polluante, et ne permet pas l'établissement d'une agriculture durable (SAVARY et TENG, 1994).

Les insecticides chimiques ont longtemps été considérés comme la seule méthode de lutte. Néfastes pour les équilibres biologiques, rarement sélectifs, ces pesticides détruisent les insectes déprédateurs mais aussi leurs ennemis naturels. Leur emploi intensif a provoqué l'apparition de résistances chez les insectes ciblés et a conduit à une augmentation considérable des doses utiles. Par exemple, près de 30 % du marché mondial des insecticides chimiques sont consacrés à la protection de la culture cotonnière.

Depuis quelques années, afin de combattre les effets de ces traitements abusifs, le concept de lutte

La bactérie *Bacillus thuringiensis* et la création de plantes transgéniques résistant aux insectes

Découverte pour la première fois en 1902 au Japon dans un élevage de vers à soie, la bactérie *B. t.* fut isolée à nouveau et identifiée en Thuringe (Allemagne) par BERLINER, en 1911, à partir d'une population de teignes de la farine.

B. t. synthétise des toxines entomopathogènes

B. t. est une bactérie gram-positif, qui synthétise, lors du processus de sporulation, des inclusions cristallines entomopathogènes. La structure cristalline de l'inclusion résulte de l'assemblage de sous-unités, les protoxines, également appelées δ -endotoxines. La plupart des souches de *B. t.* produisent plusieurs protéines cristallines différentes. Les mêmes protéines cristallines peuvent être présentes dans des souches différentes. Les δ -endotoxines *Cry* sont très spécifiques.

Au moins 40 gènes codant pour des protoxines ont été isolés et séquencés à partir d'un grand nombre d'isolats de *B. t.* Une classification de ces gènes a été établie (HOFTE et WHITELEY, 1989). Elle est fondée sur les homologues de structure et sur la spécificité de la toxine protéique. Les gènes sont regroupés en quatre classes majeures : *cryI*, *cryII*, *cryIII* et *cryIV*, elles-mêmes subdivisées en sous-classes. De nouvelles toxines sont régulièrement identifiées.

Les δ -endotoxines sont dissoutes dans l'intestin de l'insecte (à cause du pH alcalin). Elles sont ensuite activées par des protéases intestinales qui clivent la protoxine pour donner un plus petit polypeptide, correspondant à la toxine elle-même. La toxine agit en se fixant à la surface des cellules de l'épithélium de l'intestin moyen, elle entraîne ensuite des lésions qui conduisent à la destruction des cellules et à la mort de l'insecte.

Utilisation de *B. t.* pour la création de plantes résistant aux insectes

L'avantage majeur de cette utilisation est sa totale innocuité pour les êtres humains, les mammifères et la faune biologique non ciblée. L'emploi des souches de *B. t.* comme biopesticides en pulvérisation — réalisé depuis plus de 30 ans avec différentes formulations de souches de *B. t.* — reste relativement réduit, essentiellement à cause de la faible rémanence au champ.

La stratégie des plantes transgéniques permet d'obtenir la production de la toxine par la plante elle-même. L'ensemble de la plante est protégé, en particulier contre des insectes, comme les foreurs, attaquant des parties difficilement accessibles par pulvérisation. L'insecte subit l'effet de la molécule dès les premiers stades larvaires. Le système est inoffensif pour l'environnement, car le produit est maintenu dans les tissus de la plante.

Un certain nombre de toxines ont été testées sur les principaux ravageurs du cotonnier et du riz : il est donc possible de savoir quels sont les gènes à introduire dans le génome de ces deux espèces (tableau 1).

Tableau 1. Les toxines actives sur les principaux ravageurs du riz et du cotonnier.

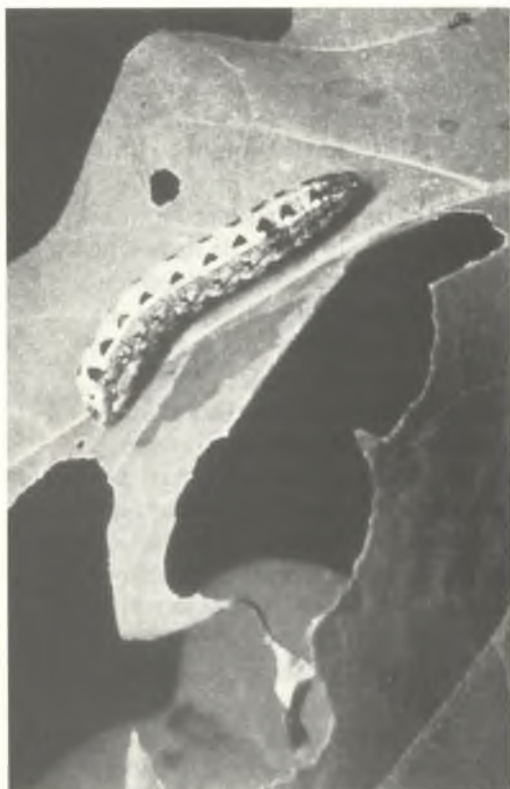
Insecte	Type de ravageur	Toxine active
Cotonnier		
<i>Spodoptera littoralis</i>	lépidoptère phyllophage	<i>CryIC</i>
<i>Helicoverpa armigera</i>	lépidoptère carpophage	<i>CryIA(b)</i> , <i>CryIA(c)</i>
<i>Pectinophora gossypiella</i>	lépidoptère carpophage	<i>CryIA(b)</i> , <i>CryIA(c)</i>
<i>Cryptophlebia leucotreta</i>	lépidoptère carpophage	<i>CryIA(b)</i> , <i>CryIA(c)</i>
Riz		
<i>Chilo suppressalis</i>	lépidoptère foreur	<i>CryIA(a)</i> , <i>CryIA(c)</i> , <i>CryIB</i>

intégrée, ou *Integrated Pest Management*, a été développé. Il implique de conjuguer toutes les méthodes susceptibles de préserver les cultures : les techniques culturales, le contrôle biologique, l'exploitation des caractéristiques génétiques de la plante (la recherche de variétés résistantes) et l'application d'insecticides chimiques. La mise en place d'un programme de lutte intégrée est complexe et réclame une excellente connaissance des méthodes utilisables, des ravageurs et du contexte agroécologique. Les techniques de génie génétique, qui permettent le transfert et l'expression de gènes codant pour des protéines entomopathogènes, sont aujourd'hui exploitées pour la création de variétés résistant aux insectes ravageurs.

Avec les technologies de transformation génétique, le chercheur manipule « directement » le génome. Alors qu'il ne pouvait exploiter que la seule variabilité existant à l'intérieur de l'espèce végétale, ou — moyennant la mise en place de techniques sophistiquées — du genre botanique de la plante qu'il travaillait, il se trouve désormais doté d'un outil nouveau qui offre des possibilités très étendues. Pour obtenir une résistance aux insectes, le premier axe développé est l'utilisation des propriétés entomopathogènes de la bactérie *Bacillus thuringiensis* Berliner (appelée couramment *B. t.*).

Des plantes transgéniques pour les régions tropicales et subtropicales

En 1987, les premiers résultats de transfert de gènes de *B. t.* dans le tabac et dans la tomate ont été publiés. Depuis, des gènes de *B. t.* ont été introduits dans différentes espèces : cotonnier, peuplier, pomme de terre, riz, maïs.



Spodoptera littoralis sur feuille de cotonnier.
Cliché CIRAD, UREA

Les cotonniers transgéniques

Depuis les premières obtentions de cotonniers transgéniques en 1987 (FIRROZABADY *et al.*, 1987 ; UMBECK *et al.*, 1987), par transformation via *Agrobacterium tumefaciens* et régénération des cellules transformées par embryogenèse somatique, des firmes privées nord-américaines (Agracetus, Calgene, Monsanto) ont déployé des moyens importants pour obtenir des cotonniers résistant à certains lépidoptères. L'obtention de plantes présentant un bon niveau de résistance à ces ravageurs a été rapportée par Monsanto (PERLAK *et al.*, 1990) ; il ne s'agissait alors que d'essais en laboratoire. Plus tard, quelques lignées ont montré au champ des propriétés « insecticides » (JENKINS *et al.*, 1993). Ces résultats ont été possibles grâce à d'importantes modifications de la séquence nucléotidique du gène de *B. t.* utilisé — en l'occurrence *cryIA(b)*. En effet, les gènes de *B. t.*, d'origine bactérienne, s'expriment très faiblement dans un contexte végétal.

Des résultats très intéressants ont été obtenus par l'équipe du Docteur N. TROLINDER (USDA, Etats-Unis), concernant la résistance au 2,4-D (acide 2,4 dichlorophénoxyacétique) utilisé comme herbicide, par transfert d'un gène provenant de la bactérie du sol *Alcaligenes eutrophus*. Ces travaux ont été repris au CSIRO (Australie) où des études sur la création de variétés résistant aux insectes sont également conduites dans le cadre d'une collaboration avec Monsanto.

La mise sur le marché de cotonniers transgéniques est annoncée comme imminente. Calgene et Monsanto — qui a conclu des accords avec Deltapine, firme semencière nord-américaine — ont déposé des dossiers d'homologation pour des variétés de cotonniers transgéniques résistant à un des deux herbicides — le bromoxynil ou le glyphosate — ou résistant à certains lépidoptères après le transfert d'un gène de *B. t.* Les travaux du CIRAD sur le cotonnier ont été lancés en 1989, dans le cadre

d'une collaboration avec l'INRA. Ils sont réalisés au laboratoire de biologie cellulaire du centre INRA de Versailles (France).

Le transfert de gènes d'intérêt agronomique au génome du cotonnier est effectué par la méthode de transformation via *A. tumefaciens*. Deux gènes de *B. t.* ont été retenus. Le premier, *cryIA(b)*, code pour une toxine active sur *H. armigera* et *Cryptophlebia leucotreta*. Le second, *cryIC*, isolé et cloné à l'Institut Pasteur (SANCHIS *et al.*, 1989) code pour une protéine très active sur *Spodoptera littoralis*.

La régénération des cotonniers et l'expression des gènes transférés

Il s'agissait tout d'abord de régénérer le cotonnier *in vitro*. Reprenant pour une large part les résultats publiés par TROLINDER et GOODIN (1988), la régénération de plantes de variétés Coker (C310, C312, C201) a été obtenue par un processus d'embryogenèse somatique¹.

La priorité a été donnée à la transformation de ces variétés présentant de bonnes capacités de régénération, plutôt qu'à la mise au point de l'embryogenèse somatique et de la transformation des variétés créées par le CIRAD. D'après les données de la littérature, très peu de variétés autres que les variétés Coker ont été régénérées avec succès. Par ailleurs, les transgènes peuvent être transférés de la variété Coker transformée aux variétés commerciales par la méthode classique des rétrocroisements.

Les principaux paramètres intervenant dans la transformation via *A. tumefaciens* à partir de fragments d'hypocotyles ont été définis.

(1). L'embryogenèse somatique : à partir d'un fragment d'organe (ici, un morceau d'hypocotyle) mis en culture sur un milieu nutritif approprié, on obtient la formation d'un amas cellulaire inorganisé, appelé cal. Certaines des cellules du cal donnent ensuite naissance à un embryon somatique, en reproduisant de façon plus ou moins similaire les étapes de la formation d'un embryon à partir du zygote issu de la fécondation.



Plant de cotonnier transformé.
Cliché C. Pannetier

La bactérie *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens transfère une partie de son information génétique au génome de la plante

A la suite de blessures, la bactérie *A. tumefaciens* provoque l'apparition de tumeurs au niveau du collet. Cette maladie a été appelée galle du collet ou « crown gall ». En 1974, une corrélation a été établie entre la manifestation de la maladie et la présence dans la bactérie d'un plasmide de haut poids moléculaire, le plasmide Ti, pour « tumor inducing ». L'ADN nucléaire des tissus tumoraux intègre un fragment d'ADN du plasmide Ti, c'est l'ADN-T (pour ADN transféré) (figure 1). Le plasmide Ti porte des gènes responsables de la virulence de la bactérie (figure 2).

Une fois intégrés au génome végétal, les gènes portés par l'ADN-T s'expriment. Il s'agit, d'une part, des oncogènes qui contrôlent la synthèse d'auxines et de cytokinines, qui induisent une prolifération continue et incontrôlée des cellules végétales d'où la formation de tumeur. Il s'agit, d'autre part, des gènes de synthèse d'opines, qui sont utilisées par la bactérie comme substrat de croissance.

Les propriétés d'*A. tumefaciens* pour le transfert de gènes d'intérêt au génome de plantes cultivées

La bactérie *A. tumefaciens* réalise un processus de transfert de gènes. L'idée s'est donc développée d'utiliser cette propriété pour transférer des gènes d'intérêt en les intégrant à l'ADN-T. Différents vecteurs fonctionnant en système binaire (figure 3). Le plasmide Ti est remplacé par deux plasmides. Le premier plasmide, souvent appelé vecteur autonome, porte un ADN-T réduit aux frontières, mais entre lesquelles ont été intégrés les gènes à transférer à la plante. Le second plasmide, dit « plasmide Ti désarmé » (l'ADN-T a été supprimé), porte les fonctions de virulence qui agissent en « trans » c'est-à-dire qu'elles permettent le transfert de l'ADN-T du vecteur autonome.

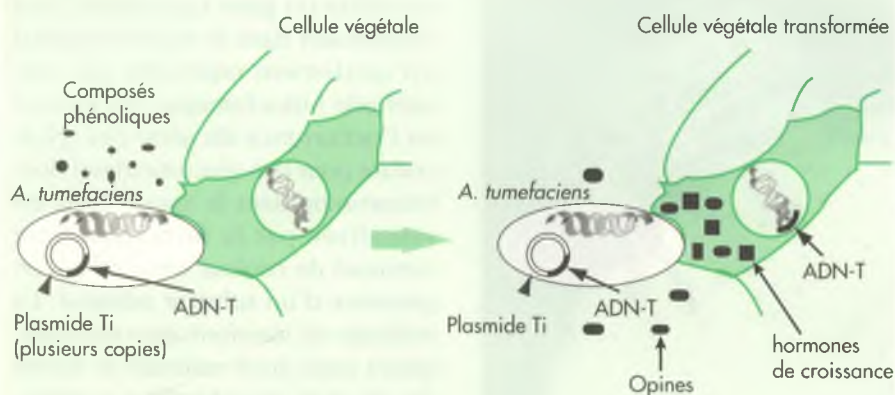


Figure 1. La bactérie *Agrobacterium tumefaciens* transfère une partie de son information génétique au génome de la plante.

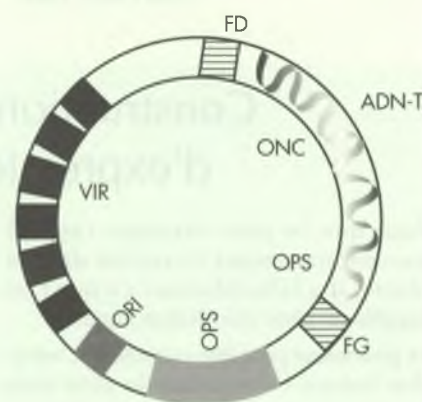


Figure 2. Schéma du plasmide Ti.

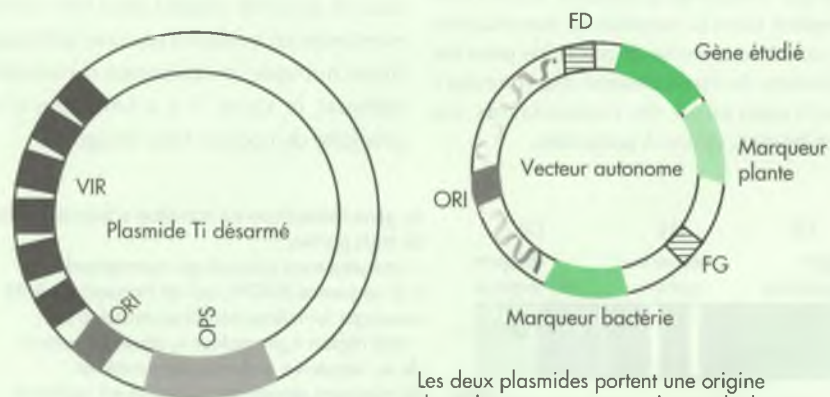


Figure 3. Schéma du système binaire.

Les deux plasmides portent une origine de réplication qui autorise leur multiplication dans *A. tumefaciens* mais aussi dans *E. coli*. Cette bactérie est utilisée pour la fabrication de la région à transférer au génome de la plante.



Anthonomus grandis
sur un bouton floral de cotonnier.
Cliché CIRAD, UREA

Dans cette phase de mise au point, on utilise un gène rapporteur, dont l'expression dans le matériel végétal est facilement repérable par une méthode histochimique. Il s'agissait en l'occurrence du gène *gus* (gène codant pour la β -glucuronidase) dont l'expression dans le tissu végétal est visualisée par la formation d'un composé de couleur bleu indigo, en présence d'un substrat adéquat. La méthode de transformation est maintenant assez bien maîtrisée et donne des résultats reproductibles. L'utilisation d'une souche d' *A. tumefaciens* porteuse d'un plasmide contenant un gène sélectionnable ainsi que le gène de *B. t.*, *cryIA(b)*, actif sur *H. armigera*, ravageur majeur du cotonnier en Afrique et en Asie, a permis

l'obtention de plantes transgéniques. Ces plantes ont été autofécondées et ont produit des graines (PANNETIER *et al.*, 1994).

Pour assurer à la plante transgénique un niveau de protection suffisant à l'égard des insectes ravageurs, il est nécessaire que les gènes de *B. t.* transférés dans son génome s'expriment à un bon niveau. Or ces gènes, comme on l'a déjà signalé, sont d'origine bactérienne, et s'expriment très faiblement dans un contexte végétal. Deux stratégies ont été retenues pour améliorer l'expression des gènes de *B. t.* : la modification de la séquence nucléotidique, et l'insertion, en amont du gène d'intérêt, de séquences entraînant une traduction plus efficace (MAZIER *et al.*, 1994). Des plantes de cotonnier potentiellement transformées, et ayant intégré l'ADN-T d'un vecteur se caractérisant par la présence d'une séquence (séquence « leader omega » du virus de la mosaïque du tabac) susceptible d'améliorer l'efficacité de la traduction de gènes situés en aval, ont été obtenues.

Des travaux visant à la modification de la séquence nucléotidique du gène codant pour la toxine active sur *S. littoralis* ont été conduits. Dans un premier temps, c'est le tabac — plante modèle des laboratoires de biologie cellulaire et moléculaire — qui est utilisé pour tester l'effet des modifications apportées aux gènes. Des gènes entièrement synthétiques — reconstruits à partir d'une séquence en nucléotides idéale, mais qui ne change pas la séquence en acides aminés — sont transférés au génome du cotonnier.

Contourner les risques de résistance

Le transfert d'un gène de *B. t.* et son expression dans le génome de variétés commerciales constituent une étape primordiale pour l'utilisation future de ces variétés transgéniques. Les travaux du CIRAD et de l'INRA, ont pour objectif une protection durable des plantes contre les ravageurs. Elle ne doit pas conduire à

Construction d'un vecteur d'expression végétale

Pour que le gène étranger (appelé souvent transgène) s'exprime dans la plante, il a fallu fabriquer ce que l'on appelle un gène chimérique (figure 4).

Le promoteur peut être constitutif, c'est-à-dire induire l'expression du gène dans toute la plante et à tout stade de développement, ou spécifique d'un organe ou d'un tissu, ou encore inductible par la blessure par exemple.

Ce gène chimérique est intégré dans un plasmide (ADN circulaire autonome) lui-même introduit dans la bactérie *Escherichia coli*. Le vecteur de transformation, ainsi constitué, peut être multiplié par culture de la bactérie. Il peut être transféré dans la bactérie *A. tumefaciens* ou utilisé sous forme de plasmide pour les méthodes de transformation dites directes : électroporation de protoplastes ou d'embryons, canon à particules.

Dans le vecteur de transformation, le gène d'intérêt est, le plus souvent, associé à un ou à plusieurs gènes sélectionnables ou rapporteurs (également sous forme de gènes chimériques). Ils permettent de sélectionner ou de détecter, par des moyens relativement simples, les cellules ou les tissus transformés. Les gènes sélectionnables sont le plus fréquemment des gènes de résistance à des antibiotiques (ou à des herbicides). Parmi les gènes rapporteurs, on utilise couramment un gène d'*Escherichia coli* codant pour la β -glucuronidase (gène *gus*). Sa présence dans le génome végétal peut être facilement mise en évidence par une technique histochimique (en présence du substrat adéquat, le Xgluc, il y a formation d'un précipité de couleur bleu indigo).

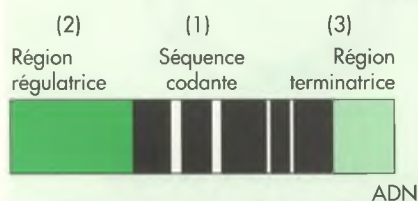


Figure 4. Structure d'un gène chimérique.

Le gène chimérique est constitué schématiquement de trois parties :

- une séquence codante qui correspond à la séquence d'ADN, qui est transcrit en ARN messager lui-même traduit en protéine (1) ;
- une région « promoteur », située en amont de la séquence codante, est constituée de plusieurs séquences, dont une est reconnue par l'ARN polymérase lui permettant de démarrer la transcription de l'ADN (2) ;
- une séquence de terminaison (3).

Réalisation de la transformation via *Agrobacterium tumefaciens*

Le processus de transformation

A titre d'exemple, le cas du cotonnier sera décrit. Un fragment d'organe (pour le cotonnier, un fragment d'hypocotyle) est mis en contact avec la bactérie *A. tumefaciens* porteuse du système binaire : c'est l'inoculation. Le tissu végétal est cultivé *in vitro* (en condition aseptique sur un milieu nutritif adapté) pendant un certain temps : c'est la coculture. Puis, on introduit dans le milieu de culture des antibiotiques : le premier a pour but de stopper la croissance des bactéries ayant servi à la transformation, le second a pour objet de sélectionner les cellules végétales transformées. En effet, dans le plasmide porteur du gène d'intérêt, on a également inséré un gène dit sélectionnable : en général ce gène confère la résistance à un antibiotique. Seules les cellules ayant intégré le gène de résistance à l'antibiotique seront capables de se diviser sur un milieu de culture contenant l'agent sélectif (le plus souvent la kanamycine). Ces cellules auront également intégré le gène d'intérêt.

L'embryogenèse des cotonniers transformés

En présence d'hormones végétales dans le milieu, les cellules transformées repiquées régulièrement sur un milieu contenant l'agent sélectif, vont donner naissance à un cal. Dans certaines conditions de milieu de culture et d'environnement (lumière, température...), des plantes seront néoformées sur ce cal par les procédés classiques de régénération *in vitro*. Pour le cotonnier, le cal va donner naissance à un tissu dit embryogène au sein duquel des embryons somatiques se développent. Ces embryons donnent ensuite naissance à une jeune plante, qui sera transférée en serre (voir planche couleur). Des analyses moléculaires et biochimiques sont ensuite réalisées pour connaître le nombre de copies du gène qui ont été intégrées, ainsi que le taux d'expression de ce gène dans le génome végétal.

l'apparition d'insectes résistants à la protéine synthétisée par la plante transgénique. Différentes stratégies ont été proposées pour diminuer ces risques. Elles sont, pour la plupart, fondées sur la diminution de la pression de sélection en réduisant les contacts entre l'insecte et la toxine : plantes refuges², rotation de plantes transgéniques et non transgéniques, plante exprimant la toxine uniquement dans certains organes... (MAC GAUGHEY et WHALON, 1992).

La stratégie retenue consiste à associer deux gènes codant pour des toxines ayant des modes d'action différents. Dans ce cas, l'avantage adaptatif acquis par l'insecte ayant développé une résistance à l'une des toxines sera réduit puisque le ravageur restera sensible à la seconde toxine.

Dans cette optique, des travaux ont été entrepris pour analyser l'intérêt de l'association de gènes codant pour des toxines de *B. t.* et des gènes codant pour des inhibiteurs de protéases. Ces inhibiteurs de protéases (HILDER *et al.*, 1987 ; RYAN, 1990) agissent en inhibant les protéases digestives de l'insecte et ont donc un effet dépressif sur sa croissance, ils n'agissent donc pas selon le même mode d'action que les toxines de *B. t.* et présentent de plus un spectre d'hôtes beaucoup plus large que ces dernières. Les bioessais sur insectes, par incorporation des inhibiteurs de protéases dans un milieu nutritif, ont mis en évidence des effets sur un lépidoptère carpo-phage, *H. armigera*, ainsi que sur un coléoptère, *Anthonomus grandis* (LE TAN-DUMANOIS, 1994). Ces travaux ont été réalisés au laboratoire d'entomologie du CIRAD.

Plus de 100 lignées embryogènes de cotonnier ayant intégré un gène d'inhibiteur de protéase ont été obtenues ; plusieurs dizaines de clones de plantes transformées ont été transférés en serre. L'analyse moléculaire et

biochimique de ces plantes est en cours, ainsi que les premiers tests sur les insectes. Les premiers résultats indiquent que la protéine est synthétisée à un taux élevé dans la plante aussi bien dans les feuilles que dans les capsules.

Les riz transgéniques

Les firmes privées de biotechnologie se sont relativement peu investies dans le génie génétique du riz, hormis Agracetus aux Etats-Unis, Japan Tobacco, Mitsui Toatsu et le Plantech Research Institute au Japon. Les résultats qui suivent sont donc issus de laboratoires publics financés en grande partie par un vaste programme de la fondation Rockefeller commencé en 1985.

Les gènes d'intérêt transférés au riz concernent à court terme la résistance aux insectes (gènes d'endotoxine de *B. t.*, inhibiteurs de protéases et de lectines de plantes), aux virus, aux bactéries, aux champignons et aux herbicides. Des riz transgéniques ont déjà été produits avec l'intégration d'un gène synthétique *CryIA(b)*, d'un gène de lectine de perce-neige, des gènes d'inhibiteurs de protéase de la pomme de terre et du niébé, des gènes de la protéine de la capsid virale des formes sphériques et bacilli-formes du virus du *tungro* et du virus du *stripe*, des gènes de résistance à la phosphinothricine et aux sulphonylurées. Cependant, peu d'essais au champ ont encore été réalisés.

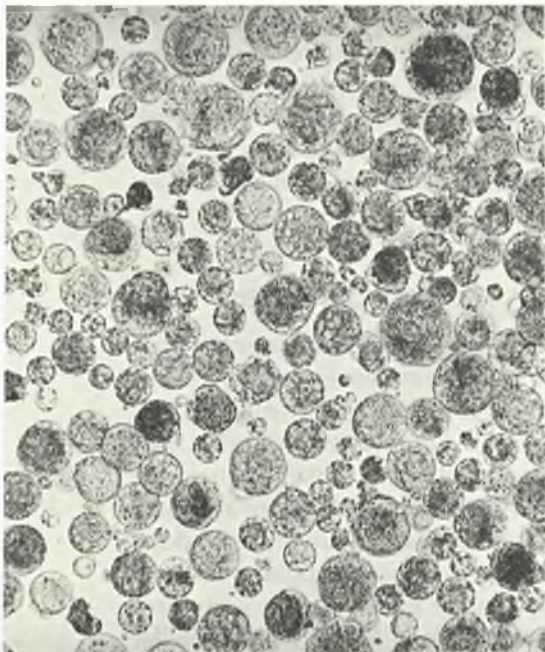
Le système de transfert est opérationnel sur le riz, alors qu'il demeure encore problématique chez les autres céréales — bien que cette situation soit en cours d'évolution.

Les recherches à moyen et à long terme visent à transférer au riz des gènes améliorant la qualité du grain, ou à augmenter sa tolérance à la sécheresse, à la salinité, à l'anoxie ou au froid.

L'obtention des riz transgéniques et les difficultés de la régénération

Les premiers riz transgéniques ont été obtenus par transfert direct de gènes sur des protoplastes de variétés du

(2). Plantes refuges : ce sont des plantes non transformées cultivées en mélange ou à proximité des plantes transgéniques (exprimant la toxine entomopathogène).



Préparation purifiée de protoplastes de riz, obtenue par traitement enzymatique de suspensions cellulaires, avant leur traitement au polyéthylène glycol.

Cliché E. Guiderdoni

groupe *japonica* tempérées (Taipei 309, Nipponbare, Yamahoushi) en 1988 (ZHANG *et al.*, 1988), soit plus de quatre ans après les premiers résultats relatant l'obtention de dicotylédones transgéniques via *A. tumefaciens* ou par transformation de protoplastes. Cela est dû au fait que la régénération de plantes à partir de protoplastes n'a été maîtrisée qu'en 1985 pour les riz du groupe *japonica*. La technique a ensuite été appliquée aux riz du groupe *indica* (IR54, IR72), en général moins aptes à la régénération (PENG *et al.*, 1992) ; mais l'efficacité de la méthode est demeurée limitée sur ces génotypes. Les riz transgéniques régénérés présentent souvent des problèmes de stérilité mâle et de niveau de ploïdie. Dans la descendance, des variations (modifications morphologiques) sont observées, accentuées par rapport aux plantes régénérées à partir de protoplastes sans traitement de transformation. On doit rappeler que ces dernières présentent déjà des différences

par rapport au témoin issu de germination (DAVEY *et al.*, 1991). Même si les publications ont été nombreuses, peu de laboratoires ont en fait réellement maîtrisé, par ce procédé, un système routinier de production en grands effectifs de riz transgéniques conformes.

Les méthodes de transfert utilisables pour le riz

En 1991, des riz transgéniques ont été produits par la firme privée Agracetus, par accélération de microparticules sur des embryons immatures de variétés des groupes *japonica* et *indica* (CHRISTOU *et al.*, 1991). Des suspensions cellulaires et des cals embryogènes ont également servi de support à une transformation par cette méthode dans d'autres laboratoires. Cette technique a été un peu abusivement déclarée universelle, car les embryons immatures de toutes les variétés de riz ne sont pas capables de régénérer des plantes et, en tous cas, pas selon un protocole unique.

Les méthodes de transfert direct

L'électroporation

D'abord mise au point sur les cellules animales et les bactéries, l'électroporation a ensuite été appliquée aux cellules végétales, débarrassées de leur paroi pectocellulosique par un traitement enzymatique, appelées protoplastes. L'absence de paroi était jugée nécessaire pour permettre le passage de l'ADN, mais les récents succès d'obtention de plantes transgéniques à partir d'embryons zygotiques ou de fragments de cals, traités ou non préalablement par une solution enzymatique, semblent prouver que le transfert par électroporation peut se faire à travers une paroi intacte sous forts voltages et capacités.

Dans la pratique, les protoplastes, mis en suspension dans une solution saline tampon, sont placés dans une cuve entre les bornes d'un électroporateur, qui délivrera une décharge de capacité (exprimée en μ Farads) et de voltage (en Volts) définis durant un temps de l'ordre de la milliseconde. Le champ électrique ainsi créé

provoque une dépolarisation des couches phospholipidiques de la membrane plasmique du protoplaste aboutissant à la création des pores transitoires permettant le passage de l'ADN.

Le traitement au polyéthylène glycol

Les protoplastes, en suspension dans une solution saline tampon, sont mis en présence d'une solution de polyéthylène glycol (composé à haut poids moléculaire), de cations bivalents (Mg^{2+} ou Ca^{2+}) et de l'ADN plasmidique. Les cations vont jouer le rôle de ponts entre l'ADN et la membrane plasmique, tous deux chargés négativement ; le polyéthylène glycol a un rôle fusionnant et déstabilisateur du plasmalemme, permettant l'entrée de l'ADN.

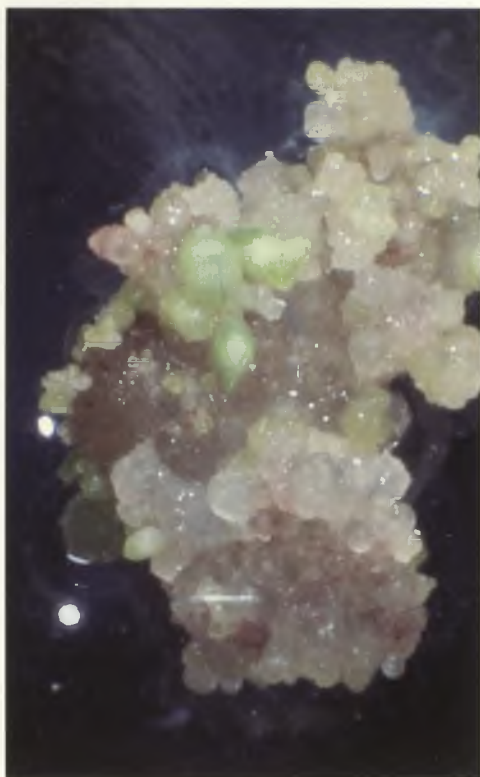
L'accélération de microparticules

L'ADN plasmidique, précipité autour de microparticules métalliques de tungstène ou d'or par l'action de l'alcool ou de sels, est déposé sur un macroprojectile (un disque de feuille d'aluminium, voire un

tamis plastique) ou dans une gouttelette d'eau, suivant le type de canon à particules. Dans le cas du disque d'aluminium, la détente d'une explosion de poudre ou d'un gaz neutre comprimé propulsera le macroprojectile qui sera stoppé dans sa course par une plaque d'arrêt, tandis que les micro-projectiles poursuivront leur trajectoire vers la cible. Dans le cas du tamis plastique, c'est un flux d'hélium qui entraînera directement les microparticules vers la cible. Dans le cas de la gouttelette d'eau, un arc électrique est créé entre les électrodes, où est déposée la gouttelette ; en entraînant sa vaporisation, le canon provoquera la propulsion des microparticules. La trajectoire des microparticules s'effectue dans une chambre, où est placée la cible et dans laquelle est créé un vide partiel pour ne pas ralentir leur course. La cible peut être, dans le cas du riz, un étalement de suspension cellulaire embryogène, des cals ou le scutellum d'embryons, voire des microspores.

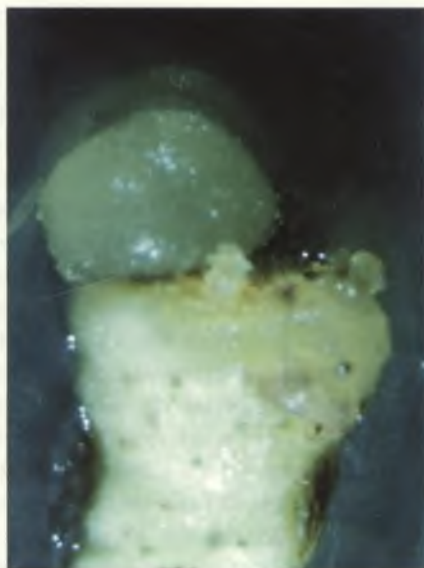
Cals embryogènes présentant
des embryons somatiques de cotonnier
en développement.

Cliché C. Pannetier



Cal transformé sur fragment
d'hypocotyle de cotonnier,
se développant sur un milieu sélectif.

Cliché C. Pannetier



Jeune plantule de cotonnier issue
du développement d'un embryon somatique.

Cliché C. Pannetier

Dégâts de *Chilo suppressalis*
dans un champ de riz.

Cliché M. Betbeder

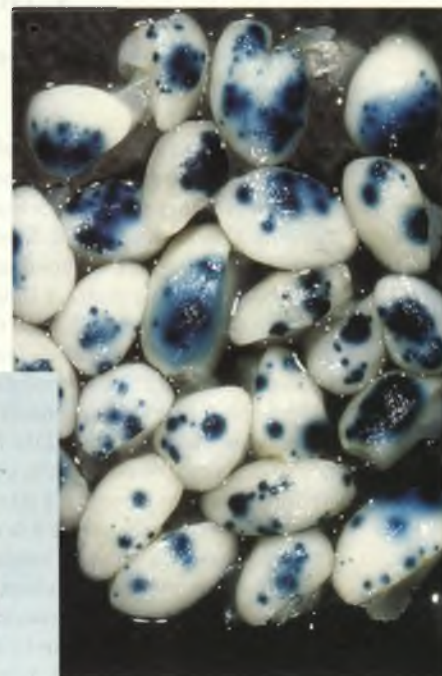


Expression du gène *gus* dans les feuilles
de jeunes plantes régénérées de riz.

Cliché E. Guiderdoni

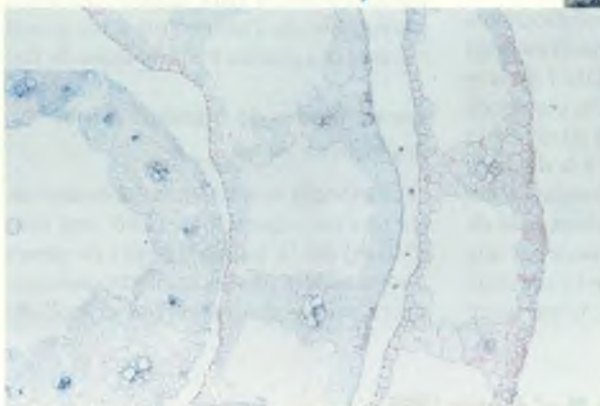
Expression du gène *gus* dans les cellules
du scutellum d'embryons immatures
de riz ayant subi un bombardement
de microparticules.

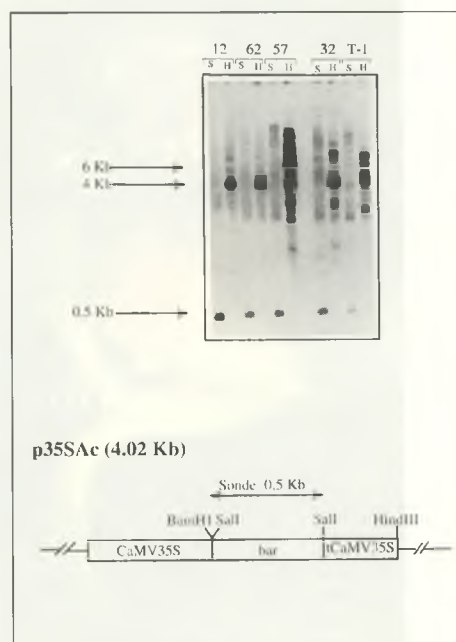
Cliché F. Georget



Section transversale de tige d'une jeune plante
de riz transformée montrant une expression
constitutive du gène *gus* dans les cellules des
différentes feuilles enroulées.

Cliché E. Guiderdoni





Exemples d'hybridation moléculaire de l'ADN de cinq plantes de riz. Elles sont transformées avec une sonde radioactive, constituée d'une séquence du gène transféré, prouvant l'intégration du transgène dans le génome du riz. Il s'agit du gène de résistance à l'herbicide glufosinate d'ammonium.
Cliché H. Chair

Cependant, elle est très probablement la méthode d'avenir pour la transformation du riz et des céréales en général. Elle est, de ce fait, utilisée par un nombre croissant de laboratoires, même si le procédé est couvert par de nombreux brevets. Comparativement à la méthode de transformation à partir de protoplastes, on peut espérer une limitation des variations évoquées précédemment : les plantes sont en général fertiles et morphologiquement normales en première génération. En effet, en culture *in vitro*, les anomalies observées dans les plantes régénérées sont parfois dues à la longueur de la phase de régénération. Celle-ci est plus courte à partir d'embryons qu'à partir de protoplastes. Il est difficile de conclure sur la supériorité de l'une de ces méthodes, car elles n'ont jamais été comparées sur un même génotype dans un même laboratoire en termes d'efficacité de production de plantes transgéniques conformes.

En 1993, une équipe taïwanaise (CHAN *et al.*, 1993), puis en 1994 une équipe japonaise (HIEI *et al.*, 1994) ont produit les preuves moléculaires que le riz peut être transformé par *A. tumefaciens* avec une efficacité liée à l'aptitude à la régénération du génotype.

Le transfert de résistance aux foreurs sur les riz méditerranéens

En 1990, un projet de transfert de gènes pour les variétés méditerranéennes et tropicales pluviales a été engagé par le CIRAD. L'objectif est la production de riz résistant au foreur des tiges asiatique et européen *Chilo suppressalis*, pyrale qui cause des pertes de rendement de l'ordre de 7 à 15 quintaux par hectare en Camargue, ainsi qu'aux foreurs africains *Maliarpha separattella* et *Chilo zacconius*. Ces travaux sont conduits dans l'unité BIOTROP du CIRAD (Montpellier).

Bien que des variétés relativement tolérantes aux foreurs existent naturellement, la nature polygénique du contrôle du caractère rend, d'une part, le transfert difficile par les voies conventionnelles, et, d'autre part, la stabilité de la tolérance n'est pas assurée dès lors que la variété est largement diffusée. Pour des raisons pratiques, le projet, qui porte sur le transfert de gènes d'endotoxines de *B. t.*, a d'abord concentré ses efforts sur le riz méditerranéen et sur *C. suppressalis*. Les méthodes mises au point, aussi bien pour l'identification des toxines actives que pour la transformation, pourraient être

Choix de la méthode de transformation

Pourquoi *A. tumefaciens* n'est-il pas utilisé sur le riz ?

Le riz comme les autres céréales s'est montré réfractaire à une infection par les bactéries. L'absence de formation de tumeurs à partir des tissus différenciés de ces plantes ne serait pas cependant due à l'agrobactérie mais plutôt à l'incapacité de la plupart de leurs cellules à entrer en prolifération. Une expérience réalisée en 1986 par GRIMSLEY et ses collaborateurs a démontré que *A. tumefaciens* était capable de transférer son ADN-T dans le noyau de la cellule de céréale. L'absence de formation de tumeurs à partir de la cellule de céréale serait due à la différence de réponse à la blessure existant entre la cellule de mono-cotylédone et celle de dicotylédone : la première réagit par une dégénérescence tandis que la seconde forme un tissu cicatriciel. C'est donc

l'absence des conditions favorables à la reprise des divisions dans la cellule, qui vient d'être infectée par l'agrobactérie, qui serait responsable de l'inefficacité des transferts pour les graminées.

Après les premiers travaux réalisés par une équipe taïwanaise, les chercheurs japonais de Japan Tobacco ont réussi, par la coculture de proliférations embryogènes de ces mêmes cellules avec des agrobactéries, à faire la démonstration irréfutable de l'obtention d'un grand nombre des plantes transgéniques de riz.

Les méthodes de transfert direct appliquées au riz

Les méthodes ayant permis l'obtention de riz transgéniques, dès 1988, ont tout d'abord été le transfert direct de gènes par traitement physique (électroporation) ou chimique (polyéthylène glycol) de

protoplastes. La maîtrise préalable du système de régénération est nécessaire. Ce système se révèle lourd à mettre en œuvre, applicable à un nombre limité de génotypes et, du fait des longues étapes de culture *in vitro*, passant par un isolement total des cellules, potentiellement générateur de variations indésirables. Afin d'essayer de réduire ces inconvénients, des systèmes de transformation des suspensions cellulaires des cals et des scutellum d'embryons ont été mis au point. Ils ont conduit à l'obtention de riz transgéniques en 1991. Ces méthodes de transformation deviennent la méthode préférentielle de production de riz transgéniques. D'autres méthodes telles que l'électroporation de cellules de l'embryon et l'utilisation d'un champ électrique pulsé ont récemment donné de bons résultats sur cette plante.



Larve de *Chilo suppressalis*
dans une talle de riz.
Cliché J. Escoute

du génotype — sur le plan de sa fréquence, de son amplitude et de sa direction —, mais compatible avec une utilisation dans des schémas de croisement (MEZENECV *et al.*, 1995). Parallèlement, une étude de la transformation des protoplastes a permis de déterminer une méthode performante de transfert de gènes. Deux traitements permettent le transfert de gènes dans les protoplastes : un traitement chimique par le polyéthylène glycol ou un choc électrique (l'électroporation). A la suite d'études comparatives, le traitement chimique a été retenu (CHAIR, 1995). La sélection des tissus transformés est réalisée, non pas grâce à l'utilisation de la résistance à un antibiotique, mais grâce à la résistance à la phosphinotricine (herbicide Basta) conférée par l'expression du gène de la phosphinotricine acétyl transférase (ou gène *bar* issu de la bactérie *Streptomyces hygroscopicus*). Des promoteurs constitutifs permettant une expression forte pour le riz ont été identifiés.

rapidement extrapolables à des variétés de riz et à des ravageurs des régions tropicales.

Les toxines codées par les gènes *CryIA(c)*, *CryIA(a)* et *CryIB* ont été identifiées comme les plus actives contre les larves de *C. suppressalis*, aussi bien par des tests d'affinité que par des tests de toxicité (FIUZA, 1995). Les gènes natifs de ces trois toxines ont été clonés et des gènes synthétiques sont en préparation ou obtenus grâce à un accord avec le laboratoire du professeur ALTOSAAR (université d'Ottawa, Canada).

Au début de ce projet, pour la transformation génétique de variétés élites méditerranéennes, on a privilégié la méthode de transfert direct de gènes sur protoplastes. Un système de régénération de plantes a été établi à partir de protoplastes provenant de suspensions cellulaires embryogènes des variétés Ariete, Miara et Thaïbonnet (GUIDERDONI et CHAIR, 1992). La variation observée au champ dans la descendance de ces plantes s'est montrée dépendante

Un système efficace d'obtention de plantes transgéniques des variétés Miara, Ariete et Thaïbonnet, avec une fréquence de l'ordre de 0,5 à 1 pour 100 000 protoplastes traités, a donc été créé. Cependant, des difficultés sont encore fréquemment rencontrées dans la conformité des plantes, tels que l'albinisme lié à l'utilisation de protoplastes issus de cals de microspores, ou un niveau de ploidie supérieur à la normale (2n). L'utilisation de protoplastes d'origine somatique ou du canon à particules sur des embryons immatures a donné des résultats très prometteurs, et devrait résoudre ces problèmes (GEORGET, 1994).

Dans un futur proche, les effets, sur la résistance à la pyrale, de l'expression constitutive d'un gène natif et de celle d'un gène synthétique de *B. t.* dans une variété sensible et une variété tolérante, seront comparés. Ensuite, comme pour le cotonnier, des constructions plus avancées, comprenant une combinaison de deux gènes synthétiques différents ou d'un gène d'endotoxine et d'un gène

d'inhibiteur de protéases sous le contrôle de promoteurs à activité constitutive ou régulée, pourront être réalisées et transférées au riz.

Les perspectives

Avec la transformation génétique, le sélectionneur peut dépasser les limites imposées par la variabilité de l'espèce. La découverte de cette possibilité a suscité un grand espoir au début des années 80, prédisant pour les années 90 une explosion de nouvelles variétés aux caractéristiques intéressantes. Les premières recherches se sont tournées vers l'introduction de caractères à haute rentabilité commerciale (résistance aux herbicides, résistance aux insectes). L'application du génie génétique a été moins rapide que prévue, mais l'arrivée sur le marché de variétés transgéniques est maintenant imminente. Cependant, pour plusieurs d'entre elles, en particulier les plantes résistant aux herbicides, certains problèmes techniques posés par leur emploi sont actuellement débattus.

Dans le cadre des programmes développés au CIRAD, la première étape dans la création de plantes transgéniques a été la mise au point de techniques fiables et reproductibles de transfert de gènes. Le premier objectif d'amélioration variétale retenu a été la résistance aux insectes. Une valorisation efficace de plantes transgéniques porteuses de ces gènes codant pour des protéines entomopathogènes sera le fruit d'une étroite collaboration entre les biologistes, les entomologistes et les sélectionneurs. Diverses stratégies devront être définies pour cultiver ces variétés nouvelles avant de prétendre les vulgariser, en particulier en tenant compte de l'apparition de résistance.

La recherche permanente de nouvelles sources de résistance représente une condition indispensable pour une lutte efficace à long terme, grâce à des plantes transgéniques. L'efficacité de protéines de diverses origines (inhibiteurs de protéases, lectines...)

est déjà à l'étude. Un domaine potentiellement intéressant est l'utilisation de gènes de l'insecte qui pourraient entraîner des perturbations dans son développement (STEWART, 1991).

Si la résistance aux insectes ravageurs a constitué une priorité, les possibilités offertes par le génie génétique sont vastes et des recherches seront et sont même déjà engagées dans des domaines qui concernent tous les aspects de la culture. Il s'agit de la résistance aux stress abiotiques (salinité, température...), de la création d'hybrides F1, de la qualité de la fibre pour le cotonnier, de la qualité du grain de riz... Dans le cas des variétés sauvages, un important réservoir de gènes reste encore largement inexploité. Pour certaines espèces sauvages de cotonnier, de nombreux caractères utiles existent : résistance à la bactériose, stérilité mâle, résistance à la sécheresse, caractères technologiques, résistance aux insectes. Toutefois, peu de programmes d'introduction de ces caractères dans les espèces cultivées ont conduit à la création de variétés nouvelles. Les biotechnologies peuvent permettre une exploitation de cette importante diversité génétique.

L'accès à ces nouvelles technologies représente, pour les pays du Sud, un enjeu de taille. Beaucoup des applications potentielles seront largement bénéfiques en particulier pour développer des systèmes de culture à faibles intrants. La vulgarisation de variétés transgéniques doit être précédée de l'analyse de l'impact de leur utilisation sur le terrain (pratiques culturales, conséquences sur l'environnement...). Cette analyse est indispensable même si elle doit retarder les bénéfices attendus. Il convient également que les recherches engagées répondent aux besoins des pays du Sud et que des collaborations soient établies pour un accès non pas seulement au matériel végétal amélioré mais aussi aux techniques elles-mêmes.

Bibliographie

CHAIR H., 1995. Transformation génétique de protoplastes de variétés méditerranéennes de riz (*Oryza sativa* L.). Thèse de doctorat, biologie des populations et écologie, université des sciences et techniques du Languedoc, Montpellier II, France, 78 p.

CHAN M.T., CHANG H.H., HO S.I., TONG W.F., YU S.M., 1993. *Agrobacterium* mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric amylase promoter/glucuronidase gene. *Plant. Mol. Biol.* 22 : 491-506.

CHRISTOU P., FORD T.L., KOFRON M., 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important *indica* and *japonica* varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology* 9 : 957-962.

DAVEY M.R., KOTHARI S.L., ZHANG H., RECH E.L., COCKING E.C., LYNCH P.T., 1991. Transgenic rice : Characterisation of protoplast-derived plants and their seed progeny. *J. Exp. Bot.* 42 : 1159-1169.

FIROOZABADY E., DEBOER D.L., MERLO D.J., HALK E.L., AMERSON L.N., RASHKA K.E., MURRAY E.E., 1987. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 10 : 105-116.

FIUZA L.M., 1995. Etude des sites récepteurs et de la toxicité des δ endotoxines de *Bacillus Thuringiensis* Berliner chez les larves de la pyrale du riz, *Chilo suppressalis* Walker. Thèse de doctorat en sciences agronomiques, ENSAM, Montpellier, France, 179 p.

GEORGET F., 1994. Transformation de suspensions cellulaires et d'embryons immatures de riz (*Oryza sativa* L.) par accélération de microparticules : étude des paramètres influençant l'expression transitoire et stable du gène *gus*. Mémoire de DESS technologies du végétal, université d'Angers, France, 33 p.

GUIDERDONI E., CHAIR H., 1992. Plant regeneration from haploid cell suspension-derived protoplasts of mediterranean rice (*Oryza sativa* cv Miara). *Plant Cell Rep.* 11 : 618-623.

HIEI Y., OHTA S., KOMARI T., KUMASHIRO T., 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6 : 271-282.

HILDER V.A., GATEHOUSE A.M.R., SHEERMAN S.E., BARKER R.F., BOULTER D., 1987. Anovel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330 : 160-163.

HOFTE H., WHITELEY H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53 : 242-255.

JENKINS J.N., PARROT W.L., MCCARTY J.C., CALLAHAN F.E., BERBERICH S.A., DEATON W.R., 1993. Growth and survival of

Heliothis virescens (lepidoptera : noctuidae) on transgenic cotton containing a truncated form of the delta endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 86 : 181-185.

LE TAN-DUMANOIS V., 1994. Défense du cotonnier contre les insectes ravageurs : étude d'une stratégie basée sur l'expression conjointe d'inhibiteurs de protéases et de toxines de *Bacillus thuringiensis* dans la plante. Thèse de doctorat, génétique et amélioration des plantes, université Paris-Sud, Orsay, France, 110 p.

MAZIER M., 1994. Création de plantes transgéniques résistantes aux insectes. Utilisation du gène *cryIC*. Thèse de doctorat, génétique et amélioration des plantes, université Paris-Sud, Orsay, France, 176 p.

MAC GAUGHEY W.H., WHALON M.E., 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* 258 : 1451-1455.

MEZENECV N., CLEMENT G., GUIDERDONI E., 1995. Variation among progenies of diploid plants regenerated from haploid cell suspension protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breeding* 14 : 149-154.

PANNETIER C., TOURNEUR J., LE TAN V., MAZIER M., COUZO P., 1994. Genetic Engineering of cotton for Insect Pest Management in an INRA/ CIRAD research group. In *Cotton Biotechnology REUR Technical series 92*, C. Peeters (Ed.), FAO, Rome, Italie.

PENG J., KONONOWICZ H., HODGES T.K., 1992. Transgenic indica rice plants. *Theor. Appl. Genet.* 83 : 855-863.

PERLAK F.J., DEATON R.W., ARMSTRONG T.A., FUCHS R.L., SIMS S.R., GREENPLATE J.T., FISCHHOFF D.A., 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8 : 939-943.

RYAN C.A., 1990. Protease inhibitors in plants : genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28 : 425-449.

SANCHIS V., LERECLUS D., MENOU G., CHAUFaux J., GUO S., LECADet M.M., 1989. Nucleotide sequence and analysis of the N-terminal coding region of the *Spodoptera*-active δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* aizawai 7.29. *Mol. Microbiol.* 3 : 229-238.

SAVARY S., TENG P.S., 1994. Quelle agriculture demain ? *La Recherche* 271 : 1320-1328.

STEWART J. MAC. D., 1991. Biotechnology of cotton. ICAC Review Articles on Cotton Production Research n° 3, CAB International, 50 p.

TROLINDER N.L., GOODIN J.R., 1988. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*). I. Effects of source of explant and hormone regime. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 12 : 31-42.

ZHANG H.M., YANG H., RECH E.L., GOLDS T.L., DAVIS A.S., MULLIGAN B.J., COCKING E.C., DAVEY M.R., 1988. Transgenic rice plants produced by electroporation mediated plasmid uptake into protoplasts. *Plant Cell Rep.* 7 : 379-384.

Résumé... Abstract... Resumen

C. PANNETIER, E. GUIDERDONI, B. HAU — Génie génétique et amélioration du riz et du cotonnier.

Le transfert de gènes codant pour des protéines entomopathogènes permet la création de variétés de riz et de cotonnier résistant à certains insectes ravageurs. Le premier axe développé est l'utilisation de gènes codant pour des toxines « insecticides » de la bactérie *Bacillus thuringiensis*. Des gènes de *B. t.* ont été ainsi introduits dans différentes espèces : cotonnier, peuplier, pomme de terre, riz, maïs. Les premières obtentions de cotonniers transformés datent de 1987, à partir de la transformation via *Agrobacterium tumefaciens* et de la régénération par embryogenèse somatique. Quelques lignées ont confirmé au champ des propriétés insecticides, après d'importantes modifications de la séquence nucléotidique du gène de *B. t.* utilisé, car ces gènes d'origine bactérienne, s'expriment très faiblement dans un contexte végétal. Le CIRAD, en collaboration avec l'INRA, conduit des recherches sur la transformation du cotonnier via *A. tumefaciens* pour la résistance à *Heliothis armigera* — gène de *B. t.*, *cryIA(b)* — et à *Spodoptera littoralis* — gène de *B. t.*, *cryIC*. Mais, l'utilisation de plantes synthétisant une seule toxine de *B. t.* peut entraîner l'apparition de résistance chez les insectes ciblés. Différentes stratégies peuvent être développées pour éviter l'apparition de cette résistance. Celle qui est étudiée par l'équipe CIRAD/INRA consiste à associer deux gènes codant pour des protéines entomopathogènes à modes d'action différents : les toxines de *B. t.* et les inhibiteurs de protéases. Des cotonniers transgéniques ayant intégré un gène de *B. t.* ou exprimant un gène d'inhibiteur de protéase ont également été obtenus et ont produit des graines. Plus de quatre ans après les premières obtentions de dicotylédones transgéniques, des riz transgéniques ont été produits. Cependant, les riz transgéniques régénérés présentent souvent des variations par rapport aux plantes conformes. L'application au transfert de résistance aux foreurs des tiges (*Chilo suppressalis*, *Maliarpha separatella*, *Chilo zacconius*) pour les riz méditerranéens et tropicaux est engagée par le CIRAD. La méthode de transfert utilise la transformation des protoplastes. Dans l'ensemble, l'application du génie génétique aux plantes cultivées a été moins rapide que prévue, mais l'arrivée sur le marché de variétés transgéniques est imminente. La vulgarisation des variétés transgéniques devra être précédée de l'analyse de l'impact de cette introduction sur les techniques culturales et sur l'environnement.

Mots-clés : cotonnier, riz, génétique, biotechnologie, *Bacillus thuringiensis*, lutte contre les insectes, toxine, inhibiteur de protéase.

C. PANNETIER, E. GUIDERDONI, B. HAU — Genetic engineering and the improvement of rice and cotton.

The transfer of genes coding entomopathogenic proteins makes it possible to create rice and cotton varieties resistant to insect pests. The first line developed is the use of genes coding the "insecticide" toxins of the bacteria *Bacillus thuringiensis*. *B. t.* genes have thus been introduced in various plants: cotton, poplar, potato, rice and maize. The first transformation of cotton was achieved in 1987 via *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration by somatic embryogenesis. Insecticide properties were confirmed in the field by several lines after substantial modification to the nucleotide sequence of the *B. t.* gene used, since *B. t.* genes of bacterial origin are very weakly expressed in a plant context. CIRAD, in collaboration with INRA, performs research on the transformation of cotton via *Agrobacterium tumefaciens* for resistance to *Heliothis armigera* (*B. t.* gene, *cryIA(b)*) and to *Spodoptera littoralis* (*B. t.* gene, *cryIC*). However, use of plants synthesising a single *B. t.* toxin may cause the appearance of resistance in the insects targeted. Different strategies can be used to prevent the occurrence of such resistance. That studied by the CIRAD/INRA team consists of combining two genes coding entomopathogenic proteins with different modes of action: *B. t.* toxins and protease inhibitors. Transgenic cotton plants incorporating a *B. t.* gene or expressing a protease inhibitor gene have been obtained and have set seed. It is only for years after the first dicots transgenic plants were obtained, that rice transformation was achieved. However, regenerated transgenic rices display more frequent variations than true-to-type plants. Application of resistance to borers (*Chilo suppressalis*, *Maliarpha separatella* and *Chilo zacconius*) in Mediterranean rice varieties has been undertaken by CIRAD. The transfer method involves protoplast transformation. As a whole, the application of genetic engineering to cultivated plants has been slower than expected, but transgenic varieties will soon be available on the market. Analysis of the impact for cropping techniques and the environment should precede the release of transgenic varieties for cropping.

Keywords: cotton, rice, breeding, biotechnology, *Bacillus thuringiensis*, insect pest control, toxin, protease inhibitor.

C. PANNETIER, E. GUIDERDONI, B. HAU — Ingeniería genética y mejora del arroz y del algodón.

La transferencia de genes que codifican proteínas entomopatógenas permite crear variedades de arroz y de algodón que resisten a algunos insectos dañinos. El primer eje desarrollado es la utilización de genes que codifican toxinas "insecticidas" de la bacteria *Bacillus thuringiensis*. De este modo, se han introducido genes de *B. t.* en diferentes especies: algodón, álamo, patata, arroz y maíz. Las primeras obtenciones de plantas de algodón transformadas datan de 1987, a partir de la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* y de la regeneración por embriogénesis somática. Algunas cepas confirmaron en el campo propiedades insecticidas tras importantes modificaciones de la secuencia nucleotídica del gen *B. t.* utilizado, pues los genes de *B. t.*, de origen bacteriano, se expresan muy débilmente en un contexto vegetal. CIRAD, en colaboración con el Instituto francés de Investigación Agrícola (INRA) está realizando investigaciones acerca de la transformación del algodón mediante *Agrobacterium tumefaciens* para la resistencia a *Heliothis armigera* (gen de *B. t.* *cryIA(b)*) y a *Spodoptera littoralis* (gen de *B. t.* *cryIC*). Sin embargo, la utilización de plantas que sintetizan una sola toxina de *B. t.* puede provocar la aparición de resistencia en los insectos destinatarios. Pueden desarrollarse diferentes estrategias para evitar la aparición de esta resistencia. La estudiada por el equipo CIRAD/INRA consiste en asociar dos genes que codifican proteínas entomopatógenas de modos de acción diferentes: las toxinas de *B. t.* y los inhibidores de proteasas. Se obtuvieron algodones transgénicos que habían integrado un gen de *B. t.* o que expresaban un gen inhibidor de proteasas y que produjeron semillas. Más de cuatro años después de las primeras obtenciones de dicotiledóneas transgénicas, se produjeron arroces transgénicos. No obstante, los arroces transgénicos regenerados presentan a menudo variaciones respecto a las plantas conformes. CIRAD ha comenzado la aplicación a la transferencia de resistencia a los barrenos (*Chilo suppressalis*, *Maliarpha separatella*, *Chilo zacconius*) en los arroces mediterráneos. El método de transferencia utiliza la transformación de los protoplastos. En general, la aplicación de la ingeniería genética a las plantas cultivadas ha sido menos rápida que lo previsto, pero la llegada en el mercado de variedades transgénicas es imminente. La difusión en cultivo de las variedades transgénicas deberá ir precedida del análisis de las consecuencias para las técnicas de cultivo y el medio ambiente.

Palabras clave: algodón, arroz, genética, biotecnología, *Bacillus thuringiensis*, lucha contra los insectos, toxina, inhibidor de proteasas.